



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 199 57 007 A 1**

⑤ Int. Cl. 7:
C 09 B 23/16

⑲ Aktenzeichen: 199 57 007.8
⑳ Anmeldetag: 26. 11. 1999
㉑ Offenlegungstag: 31. 5. 2001

DE 199 57 007 A 1

⑦ Anmelder:
FEW Chemicals GmbH Wolfen, 06766 Wolfen, DE

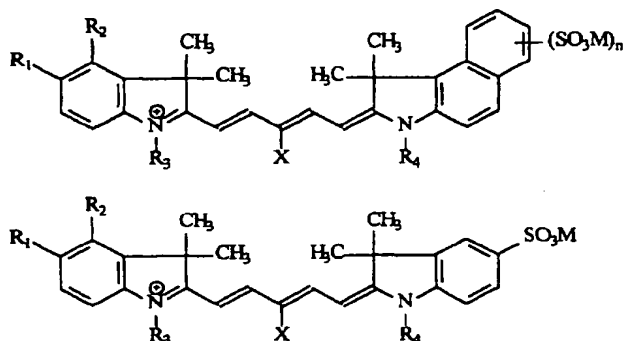
⑧ Vertreter:
v. Bezold & Sozien, 80799 München

⑦ Erfinder:
Reiner, Knut, Dr., 06766 Wolfen, DE; Ernst, Steffen,
Dr., 04107 Leipzig, DE; Mustroph, Heinz, Dr., 06844
Dessau, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤ Cyaninfarbstoffe

⑤ Es werden Cyaninfarbstoffe beschrieben, die einen Halogensubstituenten in der Kette, Sulfoarylgruppen zur Vermittlung der Wasserlöslichkeit sowie eine reaktive Gruppe, die die Bindung an Trägermaterialien ermöglicht, aufweisen.



DE 199 57 007 A 1

Die Erfindung betrifft Cyaninfarbstoffe, insbesondere für die Anwendung als Fluoreszenzmarker im Bereich 600 bis 700 nm, die sich gut in Wasser lösen, eine geringe Tendenz zur Aggregation aufweisen und mit Reaktivgruppen versehen sind.

Fluoreszenzfarbstoffe werden als Marker auf vielfältige Weise für die Analyse eines Großteils klinisch, biologisch, biochemisch oder chemisch relevanter Substanzen wie z. B. Zellen, Antikörper, Proteine, Hormone, Nucleinsäuren, Oligonucleotide, Kohlenhydrate oder Amine und Mercaptane eingesetzt. In Kombination mit der leicht detektierbaren, durch Laser induzierten Fluoreszenz (LIF; Laser-Induced Fluorescence), sind schnelle Analysen in den o.a. Gebieten möglich.

Durch kovalente Bindung kann eine größere Anzahl Farbstoffmoleküle an eine Probe angeheftet werden, als es im Fall einer unspezifischen nicht-kovalenten Bindung möglich ist, so daß die Intensität des Fluoreszenzlichtsignals stärker ist. Außerdem ermöglicht eine kovalente Bindung die eindeutige Markierung einer spezifischen Zielstruktur in einem Gemisch. Zur kovalenten Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes an die Probe werden die Farbstoffe deshalb mit Reaktivgruppen versehen. Entsprechende Reaktivgruppen sind z. B. die Iodacetamidogruppe, die Isothio-cyanatgruppe, N-Succinimidester von Alkylcarbonsäuren oder Phosphoramidite der Hydroxyalkylgruppen.

Als Reaktionspartner stehen bei Antikörpern, Proteinen, Hormonen, Nucleinsäuren, und anderen Biomolekülen u. a. Mercapto-(-SH), Amino- (-NH₂) und Hydroxygruppen (-OH) zur Verfügung.

Ganz wesentlich für die Verwendbarkeit der Fluoreszenzmarker ist neben der Löslichkeit in wäßrigen Systemen die Stabilität gegenüber photolytischer Zersetzung. Bisher bekannte Fluoreszenzmarker neigen bei Abtasten der Proben im Laserlicht, vor allem bei Verwendung eines Fluoreszenzmikroskopes, zum Ausbleichen.

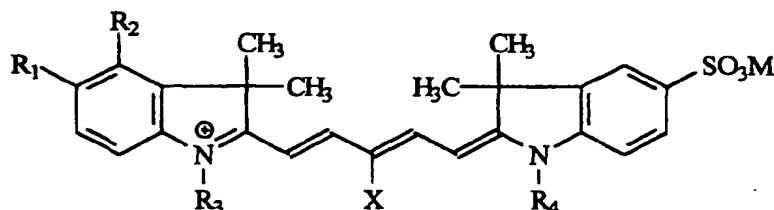
Eine Möglichkeit, die Stabilität von Cyaninfarbstoffen gegenüber Photolyse zu erhöhen, besteht in der Einführung versteifer Gruppen in die Methinkette. Bekannt ist der Einbau von partiell ungesättigten Ringen mit fünf und sechs Ringgliedern in die Methinkette. Dieses Prinzip findet Verwendung bei Heptamethin-Cyaninen.

Es ist die Aufgabe der Erfindung, neue Farbstoffe anzugeben, die eine verbesserte Stabilität gegen photolytische Zersetzung aufweisen, in Wasser gut löslich sind, eine geringe Tendenz zur Aggregation aufweisen, mit Reaktivgruppen versehen sind, und für die Anwendung als Fluoreszenzmarker im Bereich 600 bis 700 nm geeignet sind.

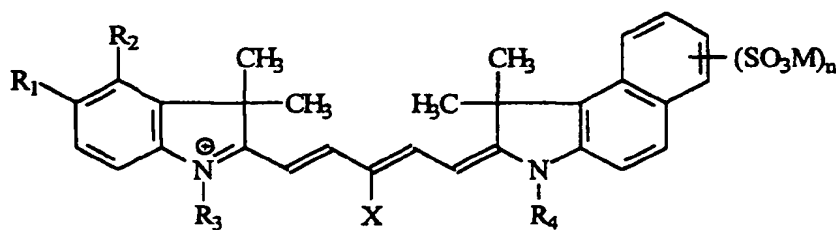
Diese Aufgabe wird durch Cyaninfarbstoffe mit den Merkmalen gemäß Anspruch 1 gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen und Verwendungen ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

Die Grundidee der Erfindung besteht darin, durch eine gezielte Einführung von Substituenten in die Methinkette den bekannten Nachteil der photolytischen Zersetzung offenkettiger Cyaninfarbstoffe zu beseitigen. Um die Fluoreszenzquantenausbeute nicht zu verringern und um unspezifische nicht-kovalente Bindungen zu verhindern, kommt es auch darauf an, jede Art der Farbstoffaggregatbildung zu vermeiden. Ein erfindungsgemäßer Cyaninfarbstoff zeichnet sich durch eine Kombination von Sulfoaryl- und N-Sulfoalkylgruppen, eine Halogensubstitution in meso-Position der Methinkette und eine reaktive Gruppe aus, die die Bindung an Trägersubstanzen ermöglicht.

Die neuen Cyaninfarbstoffe lassen sich bei Verwendung verschiedener Anregungslichtquellen im Absorptionsbereich zwischen 640 und 680 nm einsetzen und besitzen gegenüber herkömmlichen Fluoreszenzmarkern eine erhöhte Photostabilität.



Formel 1



Formel 2

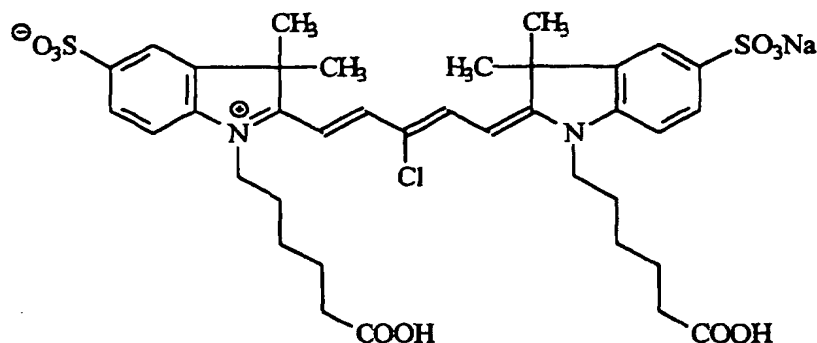
Dabei sind n = 1, 2, R₁, R₂ = H, SO₃M, die zur Vervollständigung eines Benzenringes notwendigen vier CH-Gruppen bzw. die zur Vervollständigung eines Benzenringes notwendigen vier CH-Gruppen einschließlich (SO₃M)_n, M = H, Na, K, und X = Halogen (z. B. Cl, Br).

In den allgemeinen Formeln 1 und 2 stehen R_3 und R_4 für eine Carboxyalkylgruppe oder eine Hydroxyalkylgruppe. (z. B.: R_3 = Sulfoalkyl mit vier CH_2 -Gruppen, $(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$, $(\text{CH}_2)_m\text{CH}_2\text{OH}$, $m = 2-5$, $R_4 = (\text{CH}_2)_m\text{COOH}$, $(\text{CH}_2)_m\text{CH}_2\text{OH}$, $m = 2-5$). In den Farbstoffen mit Carboxylgruppen können diese in ihre N-Succinimid-Ester überführt werden, die dann direkt mit Aminogruppen am Biomolekül reagieren oder über einen sog. Aminolinker mit Hydroxygruppen. In den Farbstoffen mit Alkylhydroxygruppen können diese in Phosphoramidite überführt werden, die direkt mit der freien 5'-OH-Gruppe von Nucleotiden zu einer Phosphitbindung reagieren, die im Folgenden zu einer stabilen Phosphatbindung oxidiert.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

1-Carboxypentyl-2-[5-(1-carboxypentyl)-1,3-dihydro-3,3-dimethyl-5-sulfo-2H-indol-2-yliden]-3-chlorpenta-1,3-dienyl]-3,3-dimethyl-5-sulfo-3H-indolium-Innersalz, Natriumsalz



A) Natriumsalz des 1-(5-Carboxypentyl)-2,3,3-trimethyl-5-sulfoindoliumbromids:

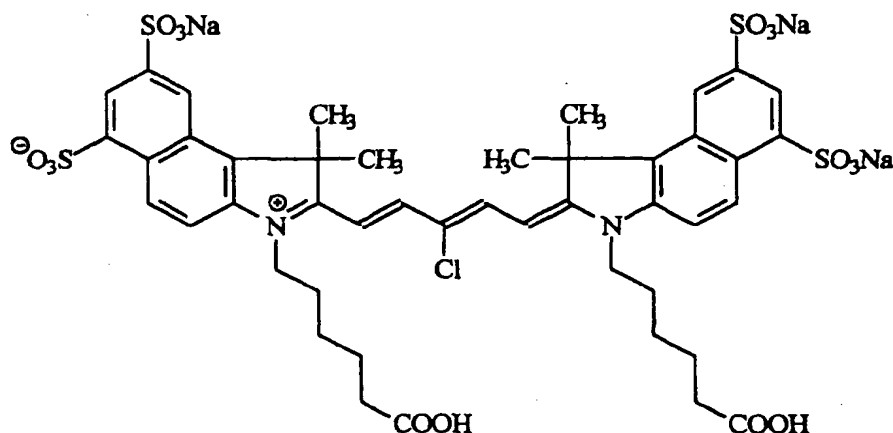
2,61 g Natriumsalz des 2,3,3-Trimethyl-5-sulfoindolenins und 2,1 g 6-Bromhexansäure werden in Substanz 2 h bei einer Badtemperatur von 110°C unter Rühren zur Reaktion gebracht. Nach beendeter Reaktion wird der ölige Rückstand mehrmals mit Aceton versetzt, bis ein Feststoff zurück bleibt. Ausbeute: 2,9 g

B) 1-Carboxypentyl-2-[5-(1-carboxypentyl)-1,3-dihydro-3,3-dimethyl-5-sulfo-2H-indol-2-yliden]-3-chlorpenta-1,3-dienyl]-3,3-dimethyl-5-sulfo-3H-indolium-Innersalz, Natriumsalz:

2,3 g des Quartärsalzes aus A) und 0,73 g des 2-Chlormalondianil-Hydrochlorids werden in 20 ml Ethanol in Gegenwart von je 1 ml Acetanhydrid und Triethylamin 25 Minuten am Rückfluß erhitzt. Nach Erkalten wird mit 2 ml 3 molarer HCl versetzt und der Farbstoff anschließend durch Etherzusatz gefällt. ($\lambda = 653 \text{ nm}$)

Beispiel 2

3-Carboxypentyl-2-[5-(3-carboxypentyl)-1,3-dihydro-1,1-dimethyl-6,8-disulfo-2H-benzo[e]indol-2-yliden]-3-chlorpenta-1,3-dienyl]-1,1-dimethyl-6,8-disulfo-1H-benzo[e]indolium-Innersalz, Trinatriumsalz



A) Natriumsalz des 3-(5-Carboxypentyl)-1,1,2-trimethyl-6,8-disulfobenzo[e]-indoliumbromids:

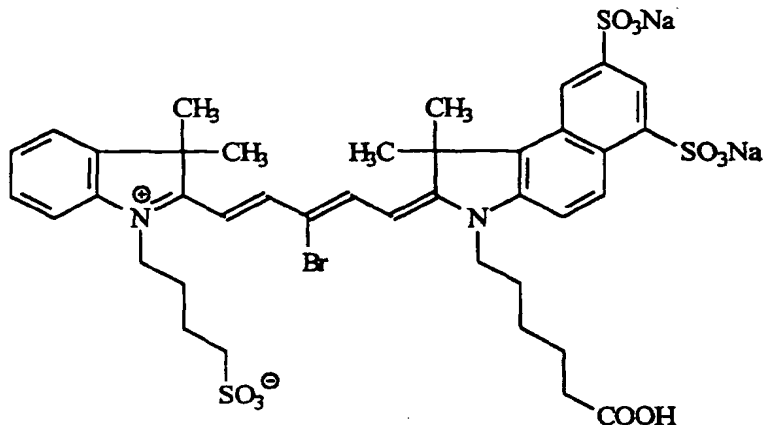
4,1 g Natriumsalz des 1,1,2-Trimethyl-6,8-disulfobenzo[e]indolenins und 2,1 g 6-Bromhexansäure werden in Substanz 2 h bei einer Badtemperatur von 110°C unter Rühren zur Reaktion gebracht. Nach beendeter Reaktion wird der ölige Rückstand mehrmals mit Aceton versetzt, bis ein Feststoff zurück bleibt. Ausbeute: 5,3 g

B) 3-Carboxypentyl-2-[5-(3-carboxypentyl)-1,3-dihydro-1,1-dimethyl-6,8-disulfo-2H-benzo[e]indol-2-yliden]-3-chlorpenta-1,3-dienyl]-1,1-dimethyl-6,8-disulfo-1H-benzo[e]indolium-Innersalz, Trinatriumsalz:

6,1 g des Quartärsalzes aus A) und 1,5 g des 2-Chlormalondianil-Hydrochlorids werden in Methanol bei Raumtemperatur unter Zusatz von 2 ml Acetanhydrid und 3 ml Triethylamin 4,5 h gerührt. Anschließend gibt man einen Tropfen konzentrierte HCl zu und fällt mit Ethylacetat. ($\lambda = 692 \text{ nm}$)

Beispiel 3

2-[5-(3-(5-Carboxypentyl)-1,3-dihydro-1,1-dimethyl-6,8-disulfo-2H-benzo[e]indol-2-yliden)-3-brompenta-1,3-dienyl]-1,1-dimethyl-3-(4-sulfobutyl)-3H-indolium Hydroxid, Innersalz, Dinatriumsalz



A) 2-(4-Acetanilino-1,3-butadienyl)-3,3-dimethyl-1-(4-sulfobutyl)-3H-indolium Hydroxid, Innersalz:

Ein Gemisch aus 11,8 g 1-(4-Sulfobutyl)-2,3,3-trimethyl-3H-indolium Hydroxid, Innersalz und 13,55 g 2-Brommalondianil-Hydrochlorid in 50 ml Acetanhydrid werden 1 h bei einer Badtemperatur von 120°C zur Reaktion gebracht. Nach Abkühlung werden 300 ml Ethylacetat zugesetzt und der anfallende Niederschlag abgesaugt. Ausbeute: 17,5 g

B) Dinatriumsalz des 3-(5-Carboxypentyl)-6,8-disulfo-1,1,2-trimethyl-benzo[e]-indoliumbromids:

4,13 g Dinatriumsalz des 6,8-Disulfo-1,1,2-trimethylbenzo[e]-indolenins und 2,15 g 6-Bromhexansäure werden in Substanz 2 h bei einer Badtemperatur von 110°C erhitzt. Der nach beendeter Reaktion verbleibende Rückstand wird mit Aceton verrieben. Ausbeute: 5,2 g

C) 2-[5-(3-(5-Carboxypentyl)-1,3-dihydro-1,1-dimethyl-6,8-disulfo-2H-benzo[e]indol-2-yliden)-3-brompenta-1,3-dienyl]-1,1-dimethyl-3-(4-sulfobutyl)-3H-indolium Hydroxid, Innersalz, Dinatriumsalz:

2,73 g der Verbindung aus A) und 3,05 g der Verbindung aus B) werden in 25 ml Pyridin in Gegenwart von 3 ml Acetanhydrid 1 h am Rückfluß erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur werden 80 ml Ethylacetat zugesetzt und der Niederschlag abfiltriert. Der Rückstand wird in Methanol aufgenommen, mit 4 ml Essigsäure versetzt und durch Etherzugabe ausgefällt. Der so erhaltene Rohfarbstoff wird durch Säulenchromatographie über Kieselgel gereinigt. ($\lambda = 674 \text{ nm}$)

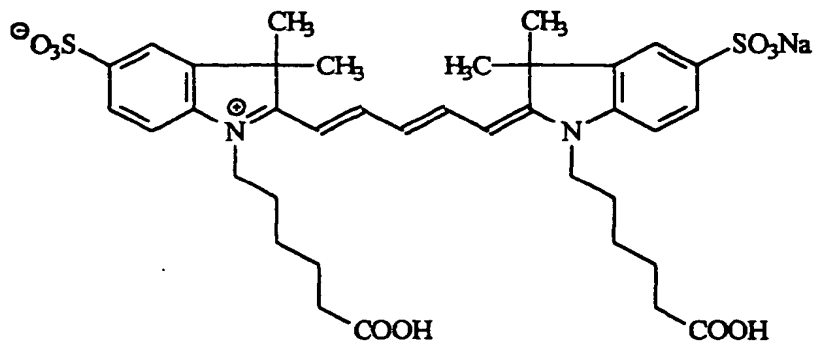
Beispiel 4

Zum Vergleich der photochemischen Stabilität der erfindungsgemäßen Farbstoffe 1 und 2 mit herkömmlichen Farbstoffen 4 und 5 wurden diese in eine inerte Schicht eingebracht und mit einer Lampe von 150 Watt Leistung bestrahlt. In Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit wurde die Extinktion bestimmt. Vom Logarithmus der normalisierten Extinktion $[\ln(E/E_0)]$ und der Lagerzeit wurde eine Korrelation durchgeführt und die Halbwertszeit $T_{1/2}$ der Zersetzung des jeweiligen Farbstoffes bestimmt. Diese Halbwertszeit dient als Maß für die photochemische Stabilität der Farbstoffe.

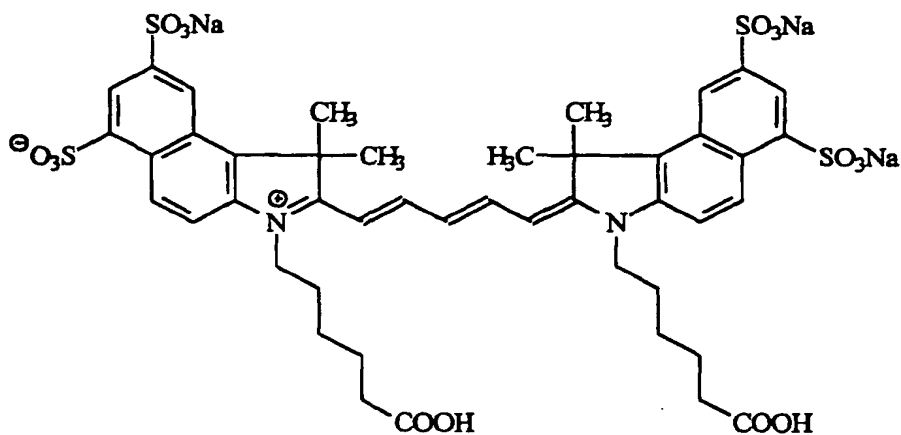
Ermittlung der relativen photochemischen Stabilität der Farbstoffe 1 und 2, gegen 4 und 5

Farbstoff	$T_{1/2}$ [min]
1	12,8
4	7,3
2	10,6
5	5,3

Vergleichsbeispiel 4

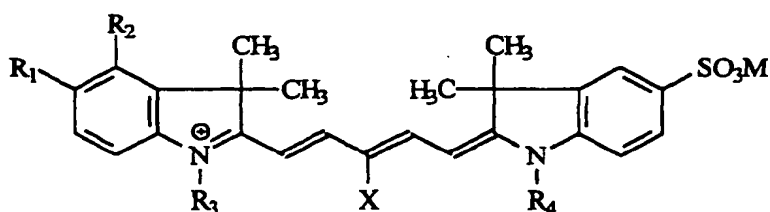
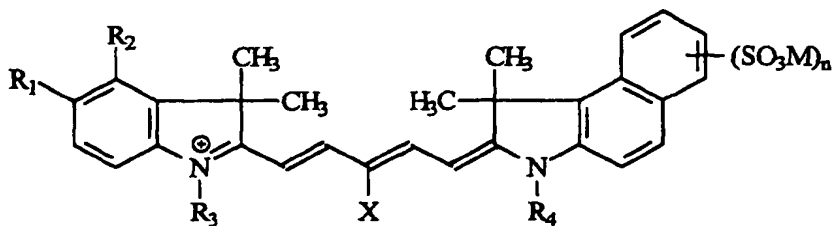


Vergleichsbeispiel 5



Patentansprüche

1. Cyaninfarbstoff, **gekennzeichnet durch** eine Kombination von Sulfoaryl- und N-Sulfoalkylgruppen, Halogensubstitution in meso-Position der Methinkette und eine reaktive Gruppe, die die Bindung an Trägersubstanzen ermöglicht.
2. Cyaninfarbstoff gemäß Anspruch 1, gekennzeichnet durch die allgemeinen Strukturen



mit:

$n = 1, 2$

$R_1, R_2 = H, SO_3M$, die zur Vervollständigung eines Benzenringes notwendigen vier CH -Gruppen bzw. die zur Vervollständigung eines Benzenringes notwendigen vier CH -Gruppen einschließlich $(SO_3M)_n$

$R_3 =$ Sulfoalkyl mit vier CH_2 -Gruppen, $(CH_2)_mCOOH$, $(CH_2)_mCH_2OH$, $m = 2-5$

$R_4 = (CH_2)_mCOOH$, $(CH_2)_mCH_2OH$, $m = 2-5$

$M = H, Na, K$

$X = Cl, Br$

3. Cyaninfarbstoff nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß

$R_3, R_4 =$ die N -Hydroxysuccinimid-Ester der Carboxylgruppe $(CH_2)_mCOOH$ mit $m = 2-5$ und das Bis- $(N,N$ -diisopropyl)- β -cyanethyl-phosphoramidit der Hydroxygruppe $(CH_2)_mCH_2OH$ mit $m = 2-5$; bedeuten.

4. Verwendung eines Cyaninfarbstoffs gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 als Fluoreszenzmarkierungsfarbstoff.